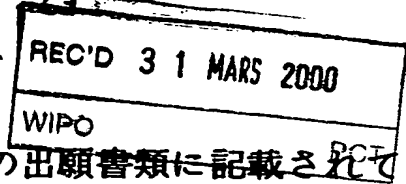


日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 2月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第042236号

出 願 人

Applicant (s):

寶酒造株式会社

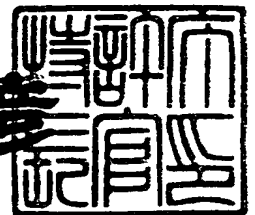
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3016204

【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1367
【提出日】 平成11年 2月19日
【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿
【国際特許分類】 A61K 31/00
A23L 1/03

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 大野木 宏

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 富永 隆生

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 西山 英治

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 務 華康

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

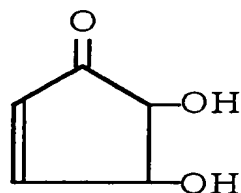
【書類名】 明細書

【発明の名称】 治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式（化 1）で表される 4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン及びそれらの誘導体から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤。

【化 1】



【請求項 2】 式（化 1）で表される 4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン及びそれらの誘導体から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生誘導剤。

【請求項 3】 式（化 1）で表される 4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン含有物、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン含有物、4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン誘導体含有物、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン誘導体含有物から選択されるものを含有、希釈及び／又は添加してなる成長因子産生誘導用食品又は成長因子産生誘導用飲料。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は細胞成長因子の調節を要する疾患に有効な医薬、製剤又は飲食品に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

成長因子は微量で細胞の成長・増殖を促進する一群の物質であり、増殖因子とも呼ばれ、細胞の増殖・伸長・肥大・分化等の制御を行っている。成長因子の生理機能としては、成長促進作用、インスリン様作用、同化作用、骨形成作用、細胞増殖促進作用、神経栄養因子様作用、エリスロポエチン様作用、子宮内発育促進作用、腎血流増加・腎細胞保護作用、免疫増強作用等が知られており、成長ホルモン不応症、糖尿病、異化状態の改善、骨粗しょう症、組織修復を必要とする疾患、神経変性疾患、貧血、子宮内発育不全、腎不全、免疫不全症等の疾患への適応が期待されている。

成長因子の疾患への適応は、通常は成長因子を外部より投与方法で行われるが、成長因子を大量に得ることは困難である。またペプチド性成長因子は遺伝子操作により調製することが可能であるが、得られた成長因子は感受性が低い場合が多く、そのため大量投与を必要とし、その結果として大量投与による、発熱や食欲不振等を始めとする様々な副作用を伴うことが知られている。

【0003】

部分肝切除を受けた肝臓は、速やかに再生し、もとのサイズになる。この肝再生因子の本体は、長年不明であったが、劇症肝炎患者の血漿中に肝細胞成長因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) が見出され、その患者血漿から、単離、精製された [Gohda, E. et al. : J. Clin. Invest. , 88 414-419, (1988)]。さらに、ヒトHGFのcDNAもクローニングされ、HGFの1次構造も明らかにされた [Miyakawa, K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. , 163 967-973, (1989)]。また、細胞の運動性を亢進させるscatter factor (SF) および、腫瘍細胞障害因子であるtumor cytotoxic factor (TCF) とHGFが同一物質であることも明らかになった [Weidner, K. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 7001-7005, (1991)、Shima, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. , 180 1151-1158, (1991)]。

HGFは肝細胞だけでなく胆管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃粘膜細胞など多くの上皮細胞の増殖を促進させる。また、上皮細胞の運動性の亢進や血管新生、上皮細胞の管腔形成で見られるような形態形成を誘導し、HGFは極めて

な生理活性を示す多機能活性物質である。つまり、HGFは様々な臓器において、その臓器の障害を修復する際の上皮細胞の増殖を促進し、運動性の亢進や血管新生などの形態形成の誘導等を行う。

HGFは肝細胞増殖作用、タンパク合成促進作用、胆汁うっ滞改善作用、さらには薬剤による腎障害の予防作用などを示す。これらのことから、HGFは重症肝炎、肝硬変および肝内胆汁うっ滞の治療薬として期待されている。しかしながら、HGFそのものを治療薬として実用化には至っていない。さらに、遺伝子治療でHGFの遺伝子を導入する方法も試みられているが、これも、実用化には遠い。

【0004】

ヒトの知的機能、記憶、感情、行動などの精神活動の維持には神経細胞が主要な役割を担っている。これら精神活動の基になっている神経細胞の分化、生存、機能発現には、それぞれの神経細胞に特異的な神経性栄養因子が必要であると考えられるが、推定の域をでない。唯一、存在および機能が明らかにされているのは、神経成長因子（以下NGFと略す）である。NGFは前脳基底部の大細胞性コリン作動性神経細胞の神経性栄養因子であることから、アルツハイマー型痴呆症との関連が注目されている〔ファルマシア, Vol.22, No.2, 147~151 (1986)、老年精神医学, Vol.3, No.6, 751~758 (1986)〕。

アルツハイマー型痴呆症とは発育障害、巣症状、下肢の強直拘攣、てんかん様発作などの臨床を伴い、老人性プラーク、アルツハイマー原線維変化などの症理学的所見を見る疾患であり、老人性痴呆の一病型である。近年の高齢化社会で増加の傾向が見られ、重大な社会的関心が払われているが、これといった症状の改善法、治療法が見つかっていない。

アルツハイマー型痴呆症患者の脳には、マイネルト基底核を中心とする前脳基底部に顕著な変性、コリンアセチル基転移酵素（CAT）活性の著しい低下が認められている〔Annu.Rev.Neurosci., 3, 77 (1980)〕。1985年にラット脳を用いた研究で、NGFが脳のこの部位での神経性栄養因子であることが明らかにされ〔EMBOJ., 4, 1389 (1985)〕、NGFと本疾患との関連が注目された。またハンチントン舞踏疾患患者の脳の線条体では、GABA作動性神経細胞の脱落と共に

ン作動性神経細胞の脱落が著しく、NGFが線条体の内在性コリン作動性神経細胞にも作用することが明らかにされ〔Science,234,1341 (1986)〕、本疾患がNGFと関連している可能性が指摘されている。さらにまた、各種の神経疾患のモデルとなり得るラットなどの動物でNGFの効果が研究され、ラットでは神経細胞の変性が顕著になる以前にNGFを脳内投与すれば、変性を食い止めることができ、CAT活性の低下も防げることが報告されている〔J.Neurosci.,6, 2155 (1986)、Brain Res.,293, 305 (1985)、Science,235,214 (1986)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83, 9231 (1986)〕。また末梢の交感神経支配組織および脳でNGFが生合成されていること、このNGFの生合成に末梢組織あるいは脳組織の間質細胞である線維芽細胞あるいはアストログリア細胞が各々重要な役割を担っていることが証明されている〔J.Biol.Chem.,259,1259 (1984)、Biochem.Biophys.Res.Comm.,136,57 (1986)〕。また、この線維芽細胞やアストログリア細胞の産生するNGFの抗原性、分子量、等電点、生物活性は、従来よく研究されていた顎下腺NGFと同一であることが明らかにされている。また線維芽細胞(L-M細胞)およびアストログリア細胞の培養液に種々の神経伝達物質を加えると、カテコールアミン(ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン)がNGF合成促進効果を示すことが見出されている〔J.Biol.Chem.,201,6039 (1986)、Febs Lett.,208,258 (1986)〕。

このように、NGFが神経性栄養因子として作用する部位が変性するこれらの神経疾患において、NGFは変性を食い止める治療薬として用いることができるのではないかと期待される。また脳血管障害、脳腫瘍、脳炎、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒など脳神経細胞が一旦変性に陥れば、生涯回復することがなく、その結果、知的機能低下、記憶障害のみならず、感情障害、行動異常など様々な障害を引き起こすが、神経線維には可塑性があり、損傷を受けると、その付近の健全な線維から発芽が起こり、障害されたシナプスに変わって新しいシナプスが形成されるので、この時NGFが神経機能の修復再生を促す治療剤として用いることができるのではないかと期待される。

しかしながら、NGFを各種神経疾患の治療に応用しようとした場合、NGFはNGFを必要とする神経細胞の極く近傍に達していなければならないし、中枢

神経疾患の場合も脳細胞の患部に N G F を送り届けなければならないが、血管系を通して N G F を脳内に送り込むことはできない。なぜならば、脳内の血管内皮細胞は、互いに密着結合で結合しており（脳血液関門という）、水、ガス、脂溶性物質以外の物質の血液から脳組織への移行は制限を受けているからであり、高分子物質である蛋白質（N G F も含む）はまったく脳血液関門を通ることが出来ないからである。この N G F を直接脳内に外科的手法を用いて投入することは、現在の技術をもってしても危険が大き過ぎる。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

成長因子の適用により、適応疾患を治療又は予防するためには成長因子を生体内で誘導する方法があり、この場合は異常な副作用を伴うことなく、安全に疾患の治療又は予防が可能になる。

例えば H G F を外から投与するのではなく、生体内で任意に誘導できるのであれば、肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の H G F 発現増強を必要とする疾患の治療及び予防に有効である。

また脳内の N G F 産生細胞に N G F を誘導させる物質を到達させることにより、in vitro で得られた成果を治療薬として応用することができる。

【 0 0 0 6 】

本発明の目的は天然物由来の、安全性の高い成長因子産生誘導能を有する化合物を提供し、成長因子産生誘導を要する疾患の治療又は予防に有用な医薬や食品を提供することにある。

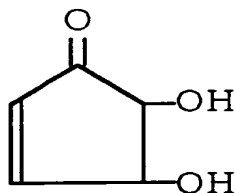
【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば、本発明の第 1 の発明は下記式（化 2）（式（化 1）と同じである。）で表される 4，5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン、4 - ヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及びそれらの誘導体から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤に関する。

【 0 0 0 8 】

【化 2】



【0009】

本発明の第2の発明は、式（化2）で表される4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン及びそれらの誘導体から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生誘導剤に関する。

本発明の第3の発明は、式（化2）で表される4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン含有物、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン含有物、4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン誘導体含有物、及び4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン誘導体含有物から選択されるものを含有、希釈及び／又は添加してなる成長因子産生誘導用食品又は成長因子産生誘導用飲料に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明で使用する4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン（以下、単にシクロペンテノンと称する）の製造方法はいかなる方法でも良く、化学合成法〔カーボハイドレートリサーチ（Carbohydrate Res.）、第247巻、第217～222頁（1993）、ヘルベチカ キミカ アクタ（Helvetica Chimica Acta）、第55巻、第2838～2844頁（1972）〕で合成しても良く、またウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される少なくとも1種の物の加熱処理物中に生成するシクロペンテノン、その精製物を使用することもでき、本

発明ではシクロペンテノンを含むこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物が使用できる。なおこれらはW O 9 8 / 1 3 3 2 8 号公報に記載され、該公報記載の内容は参考としてここに組入れる。

またシクロペンテノン含有物とは特に限定はないが、シクロペンテノンを含む上記加熱処理物、その部分精製物が本発明の第 3 の発明において特に好適に使用することができる。

本発明において 4, 5 - ジヒドロキシー 2 - シクロペンテン - 1 - オン誘導体（以下、単にシクロペンテノン誘導体と称す）とはシクロペンテノンの誘導体であって、成長因子産生誘導能を有するものであれば限定はないが、下記式（化 3）～（化 6）で表されるシクロペンテノン誘導体が例示される。

【 0 0 1 1 】

本発明で使用する 4 - ヒドロキシー 2 - シクロペンテン - 1 - オン（以下、単に 4 H C P と称する）の製造方法はいかなる方法でもよく、化学合成法で調製しても良い。その公知の合成法としては、タナカ（Tanaka, T.）らの方法〔テトラヘドロン（Tetrahedron）、第 3 2 巻、第 1 7 1 3 頁（1 9 7 6）〕、ナラ（Nara, M.）らの方法〔テトラヘドロン、第 3 6 巻、第 3 1 6 1 頁（1 9 8 0）〕、及びジル（Gill, M.）らの方法〔オーストラリアン ジャーナル オブ ケミストリー（Aust. J. Chem.）、第 3 4 巻、第 2 5 8 7 頁（1 9 8 1）〕が挙げられる。これらの方法は合成段階が多く複雑であり、収率も低く、効率の良い製造方法ではない。4 - シクロペンテン - 1, 3 - ジオンを塩化セリウム（III）及び水素化ホウ素ナトリウムで還元することによって、1 段階で、高収率で 4 H C P が得られる。

またペントース、ペントース誘導体、ペントースを含む化合物、及びペントース誘導体を含む化合物から選択される少なくとも 1 種の物の加熱処理物中に生成する 4 H C P、その精製物を使用することもでき、本発明では 4 H C P を含むこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物が使用できる。なおこれらは P C T / J P 9 9 / 0 0 1 0 9 号明細書に記載され、該明細書記載の内容は参考としてここに組入れる。

また 4 H C P 含有物とは特に限定はないが、4 H C P を含む上記加熱処理

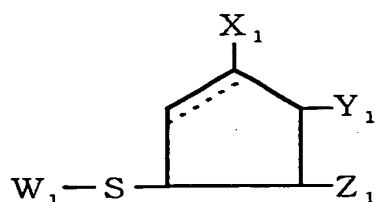
物、その部分精製物が本発明の第 3 の発明において特に好適に使用することができる。

また 4 H C P 誘導体とは 4 H C P の誘導体であって、成長因子産生誘導能を有するものであれば限定はないが、下記式（化 7）、（化 8）で表されるその誘導体が例示される。

なお本発明はこれらのシクロペンテノン誘導体含有物、4 H C P 誘導体含有物も使用できる。またシクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4 H C P、4 H C P 誘導体のそれぞれの光学活性体若しくはそれらの塩を使用することができる。

【0012】

【化 3】

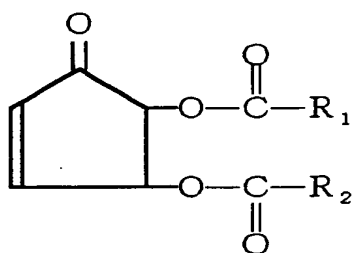


【0013】

（式中、5員環内の点線で示した結合子は当該5員環が、二重結合を有するシクロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、 X_1 はOH、 Y_1 は=O、 Z_1 はHであり、他方シクロペンタン環の場合、 X_1 は=O、 Y_1 はOH、 Z_1 はOHである。また W_1 はSH基含有化合物からSH基を除いた残基である）

【0014】

【化4】

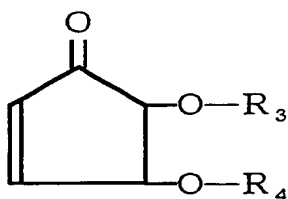


【0015】

(式中、 R_1 、 R_2 は同じであっても異なっても良く、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基である)

【0016】

【化5】

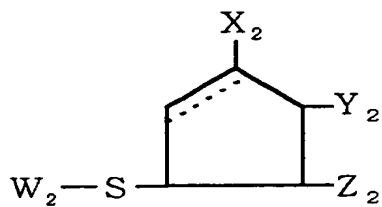


【0017】

(式中、 R_3 、 R_4 は同じであっても異なっても良く、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基である。但し、 $R_3=R_4=H$ の場合を除く)

【0018】

【化6】



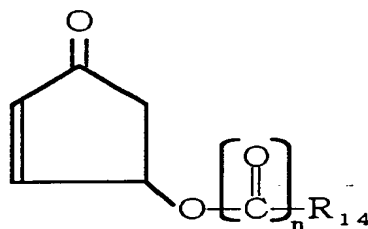
【0019】

[式中、5員環内の点線で示した結合子は、当該5員環が、二重結合を有するシ

クロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、 X_2 は OR_5 、 Y_2 は $=O$ 、 Z_2 は H であり、他方シクロペンタン環の場合、 X_2 は $=O$ 、 Y_2 は OR_6 、 Z_2 は OR_7 であり、 R_5 は R_8 、又は $-(CO)-R_9$ 、 R_6 は H 、 R_{10} 、又は $-(CO)-R_{11}$ 、 R_8 は H 、 R_{12} 、又は $-(CO)-R_{13}$ (R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} は同じであっても異なってもよく、脂肪族基、芳香族基、又は芳香脂肪族基であり、 R_9 、 R_{11} 、 R_{13} は H でもよい) を意味する。但し $R_6=R_7=H$ を除く。また W_2 は SH 基含有化合物から SH 基を除いた残基である]

【0020】

【化7】

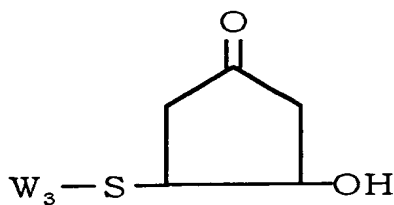


【0021】

(式中、 R_{14} は脂肪族基、芳香族基、又は芳香脂肪族基であり、 n は0又は1である。但し、 $n=0$ で R_{14} が H の場合を除く)

【0022】

【化8】



【0023】

(式中、 W_3 は SH 基含有化合物から SH を除いた残基である)

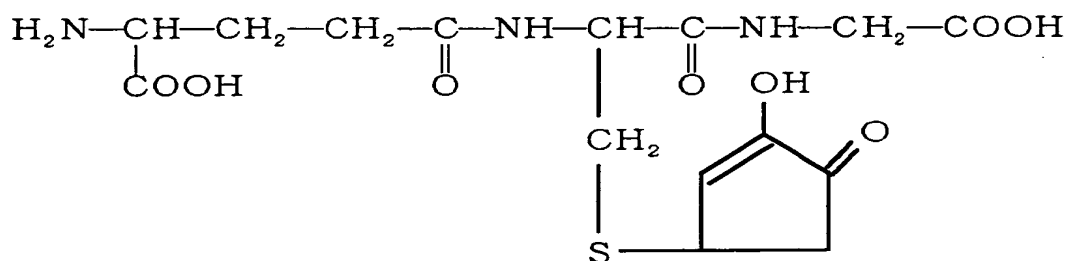
【0024】

式(化3)で表されるシクロペンテノン誘導体についてはWO98/3929

1号公報に詳細に記載されており、当該誘導体はシクロペンテノンとSH基含有化合物、例えばシステイン、グルタチオン等とを反応させることにより得ることができる。またシクロペンテノン含有物にSH基含有化合物を添加することによって、当該シクロペンテノン誘導体含有物を得ることができる。当該誘導体の例としては下記式(化9)～(化12)で表される化合物がある。なお以下、式(化9)で表される化合物を単にGMと称す。

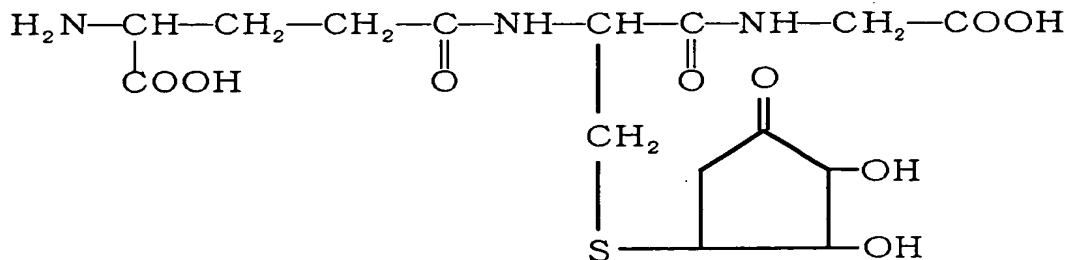
【0025】

【化9】



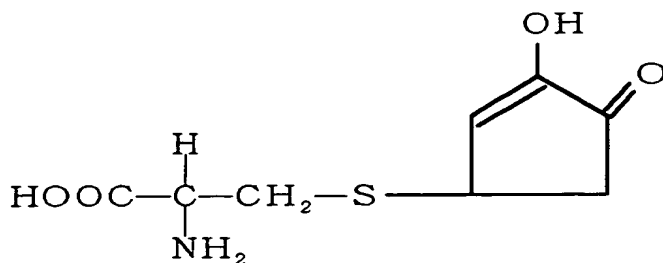
【0026】

【化 1 0】



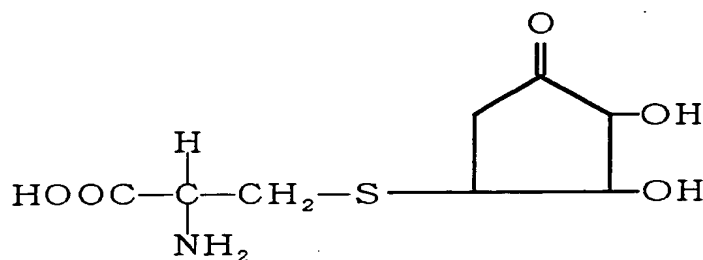
【0027】

【化 1 1】



【0028】

【化 1 2】



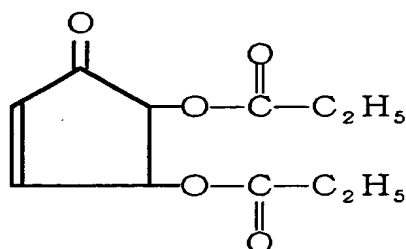
【0029】

式（化 4）で表されるシクロペンテノン誘導体については WO 98/40346 号公報、特願平 10-231659 号明細書に詳細に記載されており、シクロペンテノンと脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を有するカルボン酸及び／又はその反応性誘導体とを、同時又は順次反応させることにより得ることができる。当該シクロペンテノン誘導体としては、ジアセチルシクロペンテノン、ジベンゾイルシクロペンテノン、ジヘキサノイルシクロペンテノン、ジミリストイルシクロペンテノン、ジオクタノイルシクロペンテノン、ジ-3-オクテノイルシクロペンテノン、ジブチリルシクロペンテノン、ジデカノイルシクロペンテノン、ジバレリルシクロペンテノン、ジプロピオニルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジメトキシアセチルシクロペンテノン、メトキシフマリルシクロペンテノン、メトキシマレイルシクロペンテノン等が例示される。下記式（化 1 3）にジプロピオニルシクロペ

ンテノンの構造を示す。また下記式（化 14）にジベンゾイルシクロペンテノンの構造を示す。

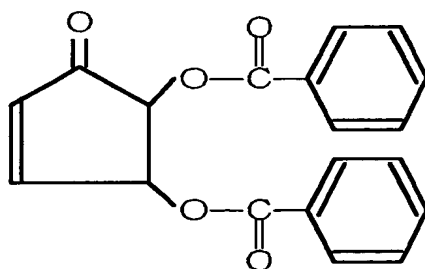
【0030】

【化 13】



【0031】

【化 14】

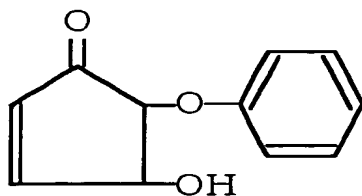


【0032】

式（化 5）で表されるシクロペンテノン誘導体については WO99/00349 号公報に詳細に記載されており、シクロペンテノンと脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を有するアルコール及び／又はその反応性誘導体とを、同時又は順次反応させることにより得ることができる。当該シクロペンテノン誘導体としては 4-ベンジルシクロペンテノンエーテル、5-ベンジルシクロペンテノンエーテル、4,5-ジベンジルシクロペンテノンエーテル、4-tert-ブチルシクロペンテノンエーテル、5-tert-ブチルシクロペンテノンエーテル、4,5-ジ-tert-ブチルシクロペンテノンエーテルが例示される。5-ベンジルシクロペンテノンエーテルの構造を下記式（化 15）に、4,5-ジ-tert-ブチルシクロペンテノンエーテルの構造を下記式（化 16）に示す。

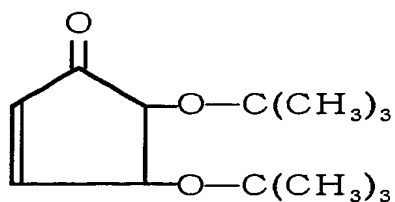
【 0 0 3 3 】

【 化 1 5 】



【 0 0 3 4 】

【 化 1 6 】

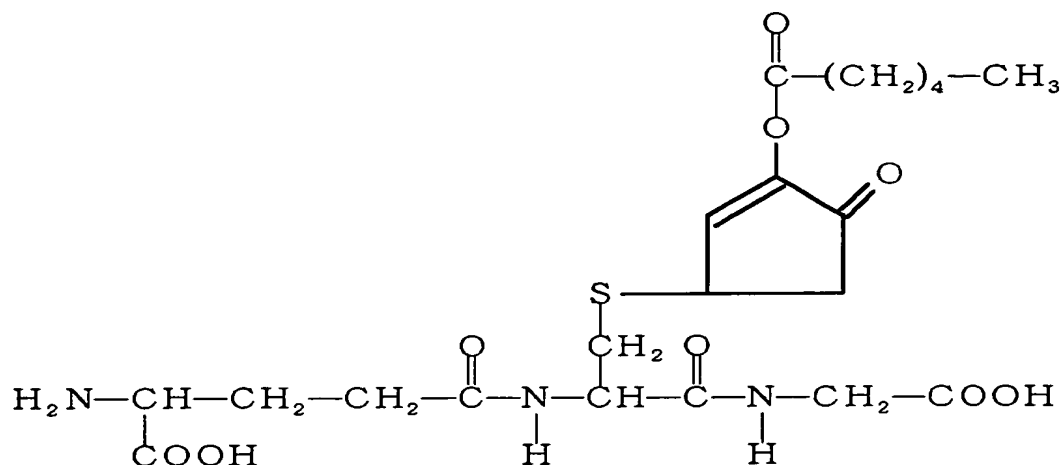


【 0 0 3 5 】

式（化 6）で表されるシクロペンテノン誘導体については特願平 1 0 - 2 3 2 7 4 6 号明細書に詳細に記載されており、式（化 4）で表される化合物又は式（化 5）で表される化合物と S H 基含有化合物、例えばシステイン、グルタチオン等とを反応させることにより得ることができる。当該シクロペンテノン誘導体含有物を得ることができる。当該誘導体の例としては下記式（化 1 7）、（化 1 8）でそれぞれ表される化合物がある。

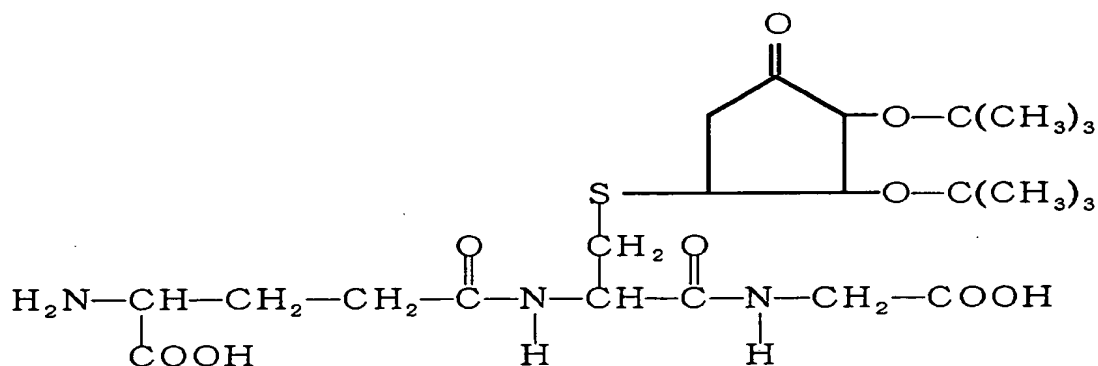
【 0 0 3 . 6 】

【化 17】



【0037】

【化 18】



【0038】

式（化 7）で表される 4HCP 誘導体は、4HCP と脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を有するカルボン酸及び／又はその反応性誘導体とを反応させること、又は 4HCP と脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を有するアルコール及び／又はその反応性誘導体と反応させることにより得ることができる。

【0039】

式（化 8）で表される 4HCP 誘導体は PCT/JP99/00109 号明細書に記載のように、4HCP と SH 基含有化合物、例えばシステイン、グルタチ

•

—

2

炎、創傷の治療又は予防を行うことができる。

【0 0 4 3】

NGFは神経細胞の生存や機能を維持したり、NGFの濃度勾配に従って神経細胞を伸長させたりする内因性の成長因子であり、NGFの産生を誘導することにより、アルツハイマー病等の老人痴呆症や末梢神経障害、脳血管障害、脳腫瘍、脳尖、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒などによる神経機能の修復再生を要する疾患の治療又は予防を行うことができる。

【0 0 4 4】

インスリン様増殖因子は種々の細胞に多彩な生理作用を有し、インスリン様増殖因子の産生を誘導することによって、II-型糖尿病（インスリン非依存性）や成長障害疾患（小人症）の治療又は予防を行うことができる。

【0 0 4 5】

なおシクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4 H C P及び4 H C P誘導体はインターロイキン1 2産生誘導能を示し、シクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4 H C P及び4 H C P誘導体から選択される化合物を有効成分とするインターロイキン1 2産生誘導剤が提供される。当該製剤はそれ自体公知の方法により、製剤化することができ、インターロイキン1 2産生誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤として使用することができる。

インターロイキン1 2は抗原感作時にA P Cより産生され、T h₁細胞を誘導する。T h₁細胞はキラーT細胞を活性化し、生体防御に関与する免疫系が亢進され、細菌、ウイルス感染細胞、がん細胞等に障害をあたえ、インターロイキン1 2の産生を誘導することによって、細菌性疾患、ウイルス性疾患やヒトがんの治療又は予防を行うことができる。

【0 0 4 6】

シクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4 H C P及び4 H C P誘導体から選択される化合物は成長因子産生誘導能を有し、これらの化合物を有効成分として成長因子産生を要する疾患の治療剤又は予防剤を製造することができる。

治療剤又は予防剤としては、シクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4 H C P及び4 H C P誘導体から選択される化合物を有効成分とし、これを公知の

医薬用担体と組合せ製剤化すればよい。一般的には、当該組成物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

【 0 0 4 7 】

当該治療剤又は予防剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い当該治療剤又は予防剤の有効成分であるシクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4 H C P 及び 4 H C P 誘導体から選択される化合物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の治療剤又は予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与することができ、外用剤には座剤等も包含される。

治療剤又は予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人 1 日当り $10 \mu g \sim 200 mg / kg$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

る。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0048】

本発明のシクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4HCP及び4HCP誘導体から選択される化合物を有効成分として含有する成長因子産生誘導剤は、上記の治療剤又は予防剤に準じ製造することができる。当該成長因子産生誘導剤は成長因子の誘導方法に使用することができ、成長因子の機能研究や、成長因子に関連する医薬のスクリーニングに有用である。

【0049】

シクロペンテノン含有物、シクロペンテノン誘導体含有物、4HCP含有物及び4HCP誘導体含有物から選択されるものを有効成分として含有、希釈及び／又は添加してなる成長因子産生誘導用食品又は成長因子産生誘導用飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に有効量の生理作用を有するシクロペンテノン含有物、シクロペンテノン誘導体含有物、4HCP含有物及び4HCP誘導体含有物から選択されるものが含有されていれば良く、成長因子産生促進作用を有する機能性食品又は飲料とすることができる。

【0050】

本発明で使用するシクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、4HCP及び4HCP誘導体はその生理活性の有効量の投与を行っても毒性は認められない。またそれらの含有物も毒性は認められない。

例えば経口投与の場合、シクロペンテノン、GM、4HCP、ジプロピオニルシクロペンテノン、ジヘキサノイルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジイソブチルシクロペンテノン、ジベンゾイルシクロペンテノン、4-*t*-ブチルシクロペンテノンエーテル、4,5-ジ-*t*-ブチルシクロペンテノンエーテル若しくはこれらの光学活性体又はそれらの塩のいずれかを100mg/kgでマウスに単回投与しても死亡例は認められない。

【0051】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

【0052】

参考例 1

(1) 10 g の D-グルクロン酸 (シグマ社製 G 5269) を 1 リットルの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後約10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2 混合液の上層40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10 ml まで濃縮した。

【0053】

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300 SP (2×28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2 kg/cm²に加圧し、毎分5 ml の流速で分離を行った。1画分当り10 ml になるようにフラクショネーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100 mg のシクロペンテノンを得た。

【0054】

この画分をパルパックタイプ S カラムを用いた順相 HPLC で分離し、215 nm の紫外吸収で検出したところ、純度は98%であった。

【0055】

(2) シクロペンテノン 30 mg、DMA P 16 mg、トリエチルアミン 66 mg 及び無水プロピオン酸 (東京化成工業社製 P0513) 86 mg を 5.9 ml のジクロロメタンに溶解し、氷冷下1時間反応させた。この反応液をクロロホルム：メタノール=200：1 を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって展開し、Rf=0.5~0.6 の部分のシリカゲルを薄層から掻き取り、クロロホルムで抽出することによって31 mg のジプロピオニルシクロペンテノンを得た。

【0056】

得られたジプロピオニルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析結果を以下に示す。

^1H -NMR

δ 7.45 (1H, dd, $J_{2-3}=6.27\text{ Hz}$, $J_{3-4}=2.15\text{ Hz}$, H-3)、6.42 (1H, dd, $J_{2-3}=6.27\text{ Hz}$, $J_{3-4}=1.49\text{ Hz}$, H-2)、5.91 (1H, m, H-4)、5.16 (1H, d, $J_{4-5}=2.97\text{ Hz}$, H-5)、2.46 (2H, dd, $J=15.01$, 7.59 Hz)、2.42 (2H, dd, $J=15.01$, 7.59 Hz)、1.18 (6H, d, $J=7.59$, 7.59 Hz)

【0057】

(3) シクロペンテノンの1M水溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ と 200 mM グルタチオン (還元型: ナカライテスク社販売: 170-10) 水溶液 (pH 3.0) $500\text{ }\mu\text{l}$ を混合し、 60°C で5時間反応させた。この反応液を $0.5\text{ }\mu\text{m}$ コスモナイスフィルターでろ過し、以下の条件でHPLCで分離した。

カラム: TSK gel ODS-80Ts ($5\text{ }\mu\text{m}$)、 $20\text{ mm}\times 25\text{ cm}$

移動相: A 0.1% TFA 水溶液

B 0.1% TFA / 50% アセトニトリル 水溶液

流速: $7.5\text{ ml}/\text{分}$

グラジエント: 10分間移動相A \rightarrow 55分かけて移動相AからA:B=1:1 \rightarrow 15分かけて移動相A:B=1:1から移動相B

検出: 220 nm における吸光度

上記反応液 $200\text{ }\mu\text{l}$ をHPLCにかけ、保持時間 35.7 分 、 36.1 分 のピークを分取し、それぞれ減圧下濃縮乾固し、乾固物 5.5 mg を得た。

【0058】

この乾固物の構造を解析した。核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、質量スペクトル (MS) を測定した。その結果を以下に示す。

^1H -NMR

δ 2.09 (2H, m, $5'-\text{H}$)、2.28 (1H, dd, $J=13.0$,

20.0 Hz, 5-H), 2.44 (2H, m, 4'-H), 2.78 (1H, dd, J=8.5, 14.0, 1'-H), 2.85又は2.89 (1H, dd, J=3.0, 6.0 Hz, 5-H), 2.92又は2.95 (1H, dd, J=1.0, 5.5 Hz, 1'-H), 3.86 (2H, s, 9'-H), 3.95 (2H, m, 4-H, 6'-H), 4.46 (1H, m, 2'-H), 6.47又は6.49 (1H, d, J=3.0 Hz, 3-H)

試料は0.1N DCl重水溶液に溶解し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

【0059】

^{13}C -NMR

δ 26.3 (5'-C), 31.7 (4'-C), 31.9又は32.1 (1'-C), 39.3 (4-C), 41.9 (9'-C), 42.2又は42.3 (5-C), 53.3 (6'-C), 54.1 (2'-C), 133.5 (3-C), 154.4 (2-C), 173付近 (3'-C, 7'-C, 8'-C, 10'-C), 205.8 (1-C)

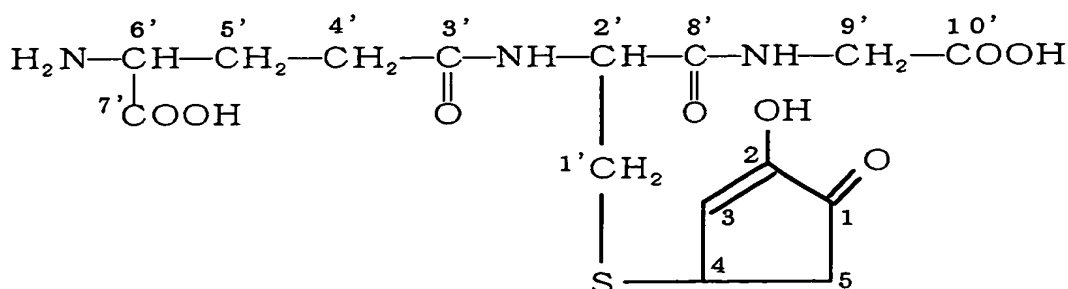
試料は0.1N DCl重水溶液に溶解し、ジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

【0060】

なお、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMRのピークの帰属の番号は下記式(化20)のとおりである。

【0061】

【化20】



【0062】

FAB-MS

m/z 404 ($M+H$)⁺, 426 ($M+Na$)⁺

グリセロールをマトリックスに用いた。

UV λ_{max} 251 nm (水)

IR ν_{KBr} ν_{max} cm^{-1} 2949, 1710, 1660, 1539, 140

4, 1203

拡散反射法によって行った。

【0063】

以上の結果から、乾固物はGM、すなわち2-ヒドロキシ-4-グルタチオン-S-イル-2-シクロペンテン-1-オン (2-hydroxy-4-glutathion-S-yl-2-cyclopenten-1-one) であった。

【0064】

実施例1

ラット繊維芽L-M細胞(ATCC CCL-1.2)を0.5%のバクトペプトン(ギブコ社製)を含むM199培地(ギブコ社製)で 1.0×10^5 細胞/mlに懸濁し24穴プレートに1mlずつまき無菌的に培養した。2日間培養後、培地をとり除き、0.5%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むM199培地に置き換えた。これにシクロペンテノン(終濃度1~25 μM)、4HCP(アルドリッチ社製)(終濃度12.5 μM)、ジプロピオニルシクロペンテノン(終濃度3.1~9.4 μM)を添加し、24時間培養した。

【0065】

培養終了後、培養液中の神経成長因子の濃度をエンザイムイムノアッセイ法(NGF Emax Immuno Assay System:プロメガ社製)にて測定した。結果、シクロペンテノン、4HCP、ジプロピオニルシクロペンテノンは濃度依存的にL-M細胞の神経成長因子産生を促進した。結果を表1~表4に示す。

【0066】

【表 1】

表1 シクロペンテノンによる神経成長因子産生誘導

シクロペンテノン濃度 (μ M)	神経成長因子濃度 (ng/ml)
0	0. 5 7 0
1	0. 7 0 0
2. 5	0. 7 4 0
5	0. 8 7 0
7. 5	0. 9 0 0
1 0	1. 0 8 0
1 2. 5	1. 3 4 0
1 5	1. 5 5 0
1 7. 5	2. 1 5 0
2 0	1. 9 0 0
2 5	1. 5 4 0

【 0 0 6 7 】

【表 2】

表2 4HCPによる神経成長因子産生誘導

4HCP濃度 (μ M)	神経成長因子濃度 (ng/ml)
0	0. 1 3 8
1 2. 5	0. 3 2 7

【 0 0 6 8 】

【表 3】

表3 シプロピオニルシクロペンテノンによる神経成長因子産生誘導

シプロピオニルシクロペンテノン濃度 (μM)	神経成長因子濃度 (ng/ml)
0	0.132
3.1	0.164
6.3	0.259
9.4	0.257

【0069】

【表 4】

表4 シクロペンテノンによる神経成長因子産生誘導 (タイムコース)

シクロ ペンテノン 濃度 (μM)	培養時間					
	0時間	3時間	6時間	12時間	24時間	48時間
	神経成長因子濃度 (ng/ml)					
0	0.000	0.028	0.233	0.575	0.658	0.736
15	0.000	0.050	0.359	0.686	1.186	1.236
17.5	0.000	0.054	0.205	0.635	1.535	1.492
20	0.000	0.082	0.179	0.581	1.681	1.874

【0070】

さらに、これら以外のシクロペンテノン誘導体も同様にL-M細胞の神経成長因子産生を促進した。

【0071】

実施例 2

5×10^4 cells/cm²となるように10%牛胎児血清を含んだDME培地に懸濁したMRC-5細胞(CCL171:大日本製薬社製、code. 02-021)を48穴の細胞培養プレートに入れ、37℃、5%CO₂存在下で2

4 時間培養後に 1% 牛胎児血清を含んだ DME 培地に交換した。その後、試料を添加し、さらに 24 時間培養した後、培地を回収し、Quantikine Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) ELISA Kit (フナコシ社製、Code. RS-0641-00) を用いて、培地中の HGF の量を測定した。

コントロールとして蒸留水を添加した。シクロペンテノン及びその誘導体を添加した細胞群は全て、無添加のコントロールより有意に HGF の生産量が増加していた。このことより、シクロペンテノン及びその誘導体には、HGF の産生誘導活性があることが示された。

【0072】

実施例 3

(1) ヒト細胞株である Hs 68 細胞 (ATCC CRL-1635) を 10% ウシ胎児血清 (FBS: バイオウイタッカー社製) を含む D-MEM 培地 (ギブコ BRL 社製) にて、5% CO₂ 存在下、37℃ で細胞が培養器に飽和になるまで培養し、トリプシン-EDTA 溶液 (バイオウイタッカー社製) で細胞を 3×10^5 個/ml となるように上記培地に懸濁し、96 穴マイクロタイタープレート (96 穴マイクロタイタープレート) の各ウェルに 200 μ l ずつ分注した。培養 5 日後、ほぼ細胞が培養器に飽和になった時点で培地を捨て、5、10、20、40、100 又は 200 μ M の 4 HCP を含有する培地を加えた。96 時間のタイムコースを取って、24 時間ずつ経時的に培養上清を回収し、Hs 68 細胞におけるヒトインスリン様増殖因子-1 (hIGF-1) 産生誘導に対する 4 HCP の影響を hIGF-1 の ELISA キット (ダイアグノスティックス システム ラボ 社製) を用いて測定した。

その結果、Hs 68 細胞において、100 μ M 以上の 4 HCP を添加した場合には、hIGF 産生誘導活性は 24 時間目に最大となり、それから経時的に減少した。結果を表 5 に示す。

【0073】

【表 5】

4HCP	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
濃度 (μM)	hIGF-1 産生誘導活性 (ng/ml)			
0	0	0	0	0
40	0	0	0	0
100	39.9	10.0	9.6	4.4
200	37.9	10.4	9.9	4.2

【0074】

(2) Hs 68 細胞を 10%ウシ胎児血清を含む D-MEM 培地にて、5% CO_2 存在下、37℃でコンフルエントになるまで培養し、トリプシン-EDTA 溶液で細胞を 3×10^5 個/ml となるように上記培地に懸濁し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに $200 \mu\text{l}$ ずつ分注した。培養 5~7 日後、ほぼコンフルエントになった時で培地を捨て、0、2.5、5、10、又は $20 \mu\text{M}$ のシクロペンテノン、又は GM を含有する上記培地を加えた。

48 時間のタイムコースを取って、1、3、6、12、24、48 時間で、経時的に培養上清を回収し、Hs 68 細胞における hIGF-1 産生（発現誘導）に対するシクロペンテノン又は GM の影響を hIGF-1 の ELISA-Kit を用いて測定した。

【0075】

その結果、Hs 68 細胞において、 $10 \sim 20 \mu\text{M}$ の GM を添加した場合は、添加後 3 時間から hIGF-1 が産生され、6 時間後には無添加の対照と比べ、倍の hIGF-1 が産生された。

また $10 \sim 20 \mu\text{M}$ のシクロペンテノンを添加した場合は、添加後 1 時間から 6 時間にかけて、hIGF-1 の産生が認められた。

【 0 0 7 6 】

以上、4 H C P、シクロペンテノン、GMはh I G F - 1 産生誘導活性を示した。また他のシクロペンテノン誘導体も同様の活性を示した。

【 0 0 7 7 】

実施例 4

(1) 注射剤

生理食塩液にシクロペンテノン又はGMを1 %濃度で加え、注射剤を作製した。

(2) 錠剤

ジプロピオニルシクロペンテノン又は4 H C Pの1 0 0 m g と微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、各錠剤を作製した。

【 0 0 7 8 】

参考例 2

d d Yマウス(メス、5週齢、体重約25 g)は日本エスエルシーより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。マウスの腹腔内に 1×10^6 cellsのエーリッヒがん細胞を接種し、接種1日後に10 mg/kgのシクロペンテノンを腹腔内投与した。癌細胞接種から8日または12日後にマウスを断頭、放血死させ、対照群の腹水貯留量と同量(2 ml)の1 %牛血清アルブミン(シグマ社)を含んだPBS(-)(日水製薬)をマウスの腹腔内に注入し、よくマッサージした後、回収した。対照群では腹水を直接回収した。

回収した腹水および腹腔洗浄液は2000 rpm、5分間遠心分離後、上清を回収してインターロイキン12量をマウスインターロイキン12測定用ELISAキット(エンドジェン社)を用いて定量した。

【 0 0 7 9 】

がん細胞接種8日後、および12日後の各マウスの腹腔内インターロイキン12量を表6に示す。がん細胞接種8日後の対照群では3例のマウス全てで検出限界以下であったのに対し、シクロペンテノン投与群では、各マウスにおいて、シクロペンテノンのインターロイキン12の産生誘導活性が認められ、局所のT細胞およびNK/LAK細胞が活性化された状態にあることが示された。また、が

ん細胞接種 12 日後においてもシクロペンテノン投与群では腹腔内にインターロイキンが確認され、免疫賦活による抗腫瘍効果が発現されていた。またシクロペンテノン誘導体も、同様に、インターロイキン 12 産生誘導活性を示した。

【0080】

【表 6】

腹腔内インターロイキン 12 量 (pg/ml)						
対照群			シクロペンテノン投与群			
8 日後	ND	ND	ND	11.0	100.0	25.0
12 日後	全例死亡			43.0	97.2	66.4

ND: 検出限界以下

【0081】

【発明の効果】

本発明により成長因子産生誘導活性を示す化合物を有効成分として含有する成長因子産生を要する疾患に有効な医薬が提供される。該医薬は、生体内における HGF 産生誘導活性、NGF 産生誘導活性、hIGF 産生誘導活性等を有し、肝炎、アルツハイマー症、糖尿病、がん等のこれらの成長因子の産生を必要とする疾患の治療剤又は予防剤として有用である。

更に、成長因子産生誘導能を有するシクロペンテノン含有物、シクロペンテノン誘導体含有物、4HCP 含有物、4HCP 誘導体含有物から選択されるものを用いて飲食品を製造することが可能になり、日常の飲食品として摂取することにより、成長因子の産生を要する疾患の症状改善等が可能となる。

従って、シクロペンテノン含有物、シクロペンテノン誘導体含有物、4HCP 含有物、4HCP 誘導体含有物から選択されるものを有効成分とする機能性飲食品は、その成長因子産生誘導作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性飲食品である。

また成長因子の産生誘導剤も提供され、当該誘導剤は成長因子の機能研究、成

長因子に関連する疾病用医薬のスクリーニングに有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 天然物由来の、安全性の高い生理機能物質の用途を提供する。

【解決手段】 4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン及びそれらの誘導体から選択される化合物を有効成分として含有する成長因子産生誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤。

上記の化合物から選択される化合物を含有する製剤。上記の化合物を有効成分とする食品、飲料としての用途。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 1 0 3 8 1 4 1]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 2 月 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町 6 0 9 番地

氏 名 寶酒造株式会社



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100